

**ISOLASI ASIATIKOSIDA DARI HERBA PEGAGAN  
(*Centella asiatica* L. Urban) DAN PENETAPAN  
KADARNYA DENGAN HPLC**

**SKRIPSI**



**Oleh :**

**DHIMAS YONET T.I  
K 100060064**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA  
SURAKARTA  
2010**

## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

#### **A. Latar Belakang**

Sekarang ini di Indonesia banyak pengobatan yang dilakukan secara tradisional yaitu dengan menggunakan bahan dari alam. Pengobatan secara tradisional ini dilakukan dengan tujuan untuk menghemat biaya pengobatan yang semakin mahal. Pengobatan tradisional ini juga dilakukan untuk memanfaatkan potensi kekayaan alam di Indonesia yang sangat beragam.

Akan tetapi masih sedikit tumbuhan berkhasiat yang telah diteliti kandungan kimia dan efek farmakologinya. Untuk itu perlu dilakukan penelitian mengenai zat aktif yang terkandung dalam tumbuh-tumbuhan tersebut, dan salah satu dari kandungan kimia penting dari tumbuhan adalah asiatikosida.

Asiatikosida merupakan triterpenoid glikosida yang didapat dari tanaman pegagan (*Centella asiatica* L. Urban) yang biasanya digunakan untuk pengobatan. Aktivitasnya antara lain untuk merevitalisasi pembuluh darah, meningkatkan perbaikan dan penguatan sel-sel, stimultan pertumbuhan kuku, rambut, jaringan ikat dan dapat melawan virus herpes simplek 1 dan 2, *Mycobacterium tuberculosis* dan *neuroprotectant*. Selain itu asiatikosida juga mempunyai aktivitas sebagai antioksidan yang cukup besar (Annisa, 2006).

Asiatikosida juga mempunyai aktivitas antioksidan yang besar pada penghilangan bekas luka / antikoloidal dengan meningkatkan pembentukan

kolagen dan angiogenesis. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa kadar 0,2 % asiaticosida secara topikal dengan pemakaian dua kali sehari selama satu minggu, asiaticosida mampu meningkatkan kadar enzimatis dan non enzimatis seperti superoksida dismutase (35%), katalase (67%), glutathione peroxidase (49%), vitamin E (77%) and asam askorbat (36%) pada pembentukan jaringan baru (Sukla *et al.*, 1999). Selain itu, diketahui pula bahwa asiaticosida juga mempunyai potensi sebagai obat antikanker.

Asiaticosida mempunyai potensi yang besar sebagai obat kemoterapi terhadap sel kanker MCF-7 dengan nilai  $IC_{50}$   $1,11 \pm 0,13$  mg/mL dengan memberikan efek sinergisme pada penggunaan bersama vinkristin (Zheng, 2004). Selain itu asiaticosida mempunyai aktivitas sebagai antidepresan yang lebih poten dibandingkan dengan klomipramin. Dosis terapi terendah yang diberikan kepada hewan uji, menunjukkan hasil yang signifikan yaitu 10 mg/bb asiaticosida setara dengan klomipramin 50 mg/bb (Liang *et al.*, 2008).

Berdasarkan manfaat dan berbagai uji farmakologi yang telah diuraikan di atas maka asiaticosida merupakan salah satu senyawa yang perlu diisolasi, karena diharapkan dapat digunakan sebagai *marker* untuk industri, memberikan panduan tentang cara isolasi asiaticosida yang benar, ekonomis dan menghasilkan senyawa dengan tingkat kemurnian yang tinggi.

Penelitian-penelitian tentang isolasi asiaticosida telah banyak dilakukan. Asiaticosida dapat diisolasi dari ekstrak air. Untuk mendapatkan senyawa murni dilakukan partisi antara senyawa halogenik yaitu kloroform dengan senyawa yang kandungan alkoholnya tinggi. Bagian alkohol dicuci

dengan NaOH dan untuk rekristalisasi digunakan etil asetat. Dalam penelitian tersebut penetapan kadar kemurnian asiatikosida ditetapkan dengan HPLC dan diperoleh kadar sebesar 84 % (Barbosa *et al.*, 2008). Penelitian yang lain menunjukkan bahwa asiatikosida dapat diisolasi dari ekstrak metanol dengan metode kromatografi kolom dengan menggunakan kombinasi fase gerak antara etil asetat dan metanol, sedangkan untuk penetapan kadar asiatikosida dapat menggunakan metode kromatografi cair kinerja tinggi atau HPLC dan diperoleh kadar sebesar 2,56 µg/mL (Zainol *et al.*, 2008).

#### **B. Perumusan Masalah**

Apakah asiatikosida dapat diisolasi dari herba pegagan (*Centella asiatica* L Urban) secara kromatografi kolom tekan dengan memodifikasi pengekstraksian awal dan berapa kadar kemurnian isolat yang didapat dari isolasi herba pegagan (*Centella asiatica* L Urban) secara HPLC ?

#### **C. Tujuan Penelitian**

Mengisolasi senyawa asiatikosida dari herba pegagan dengan memodifikasi pengekstraksian awal dilanjutkan dengan kromatografi kolom dan menetapkan kadar kemurniannya secara HPLC.

#### **D. Tinjauan Pustaka**

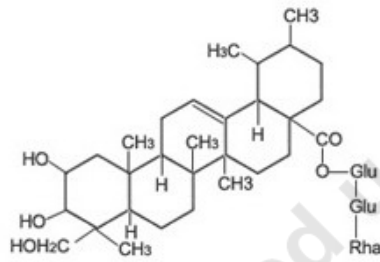
##### **1. Asiatikosida**

Asiatikosida (Gambar 1.) merupakan triterpenoid glikosida yang didapat dari tanaman pegagan (*Centella asiatica* L. Urban) yang biasanya digunakan untuk pengobatan. Asiatikosida ini mempunyai nama lain madecanol. Struktur molekul dari asiatikosida  $C_{48}H_{78}O_{19}$ , dan mempunyai berat molekul 959,19

(Robinson, 1998). Asiatikosida merupakan suatu senyawa terpenoid karena mempunyai ciri-ciri : branching yakni bercabang dengan gugus metil, itu menandakan gugus metil berasal dari salah satu dimetil isopren, jika membentuk cincin aromatis maka berbentuk tidak wajar, terdiri dari 2-8 x C<sub>5</sub>. Artinya jumlah atom karbonnya 5 x 2 sampai dengan 8. atau mendekati karena kehilangan 1 atom C, banyak terdapat karbon asimetrik, yakni empat atom yang terikat atom karbon berbeda, tidak simetris, bukan cermin. Atom O mulai dari 0 sampai multipel gugus -OH (hidroksil) dan = O (karbonil), artinya jumlah atom oksigen tidak tentu.

Berdasarkan strukturnya (Gambar 1). asiatikosida merupakan senyawa yang bersifat kurang polar karena banyaknya rantai karbon dan mempunyai panjang gelombang yang rendah karena tidak mempunyai gugus rangkap terkonjugasi (kromofor) sehingga memerlukan energi yang tinggi untuk bereksitasi karena lebih tingginya selisih energi antara HOMO (Orbital Molekul Terhuni Tertinggi) dan LUMO (Orbital Molekul Kosong terendah) dibandingkan dengan senyawa yang mempunyai ikatan rangkap terkonjugasi.

Aktivitasnya antara lain sebagai perevitalisasi pembuluh darah sehingga peredaran darah ke otak menjadi lancar, meningkatkan perbaikan dan penguatan sel-sel, *stimultan* pertumbuhan kuku, rambut, jaringan ikat dan dapat melawan virus herpes simplek 1 dan 2, *micobacterium tuberculosis* dan *neuroprotectant*. Selain itu asiatikosida juga mempunyai aktivitas sebagai antioksidan yang cukup besar (Annisa, 2006).



**Gambar 1. Struktur kimia senyawa asiaticosida**

## 2. Uraian Tentang Tanaman

Pegagan (*Centella asiatica* L Urban)

Sinonim : *Hydrocotyle asiatica* L

Familia : Apiaceae

Sistematika tumbuhan

Division : Spermatophyte

Sub division : Angiospermae

Classis : Dicotyledoneae

Sub classis : Archiclamideae

Ordo : Umbelliferae

Genus : *Centella*

Species : *Centella asiatica* L Urban

(Anonim, 1979)

## 3. Kandungan Kimia

Pegagan yang dikenal dengan Centella Herba memiliki kandungan *asiaticoside*, *thankuniside*, *isothankuniside*, *madecassoside*, *brahmoside*, *brahmic acid*, *brahminoside*, *madasiatic acid*, *meso-inositol*, *centelloside*, *carotenoids*, *hydrocotylin*, *vellarine*, tanin serta garam mineral seperti kalium, natrium,

magnesium, kalsium dan besi. Diduga glikosida *triterpenoida* yang disebut *asiaticoside* merupakan antilepra dan penyembuh luka yang sangat luar biasa. Zat *vellarine* yang ada memberikan rasa pahit. (Harborne, 1987).

#### **4. Ekologi dan penyebaran**

Tumbuh liar diseluruh Indonesia serta daerah-daerah beriklim tropis pada umumnya, dari dataran rendah hingga ketinggian 2.500 m diatas permukaan laut. Tumbuh ditempat terbuka atau sedikit kenaungan. Pada tanah yang lembab dan subur seperti tegalan, padang rumput, tepi parit, diantara batu-batu, ditepi jalan dan tembok (Heyne, 1987).

#### **5. Metode penyarian**

Ekstraksi adalah penarikan zat pokok yang diinginkan dari bahan mentah obat dan menggunakan pelarut yang dipilih dimana zat yang diinginkan dapat larut. Bahan mentah obat yang berasal dari tumbuh-tumbuhan ataupun hewan tidak perlu diproses lebih lanjut kecuali dikumpulkan atau dikeringkan. Tiap-tiap bahan mentah obat disebut ekstrak, tidak mengandung hanya satu unsur saja tetapi berbagai unsur, tergantung pada obat yang digunakan dan kondisi dari ekstraksi (Ansel, 1989).

Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan (Anonim, 1995). Untuk mendapatkan senyawa yang khas dalam suatu tumbuhan, diperlukan metode ekstraksi yang cepat dan teliti (Harborne, 1987). Pemilihan metode ekstraksi tergantung pada sumber bahan alami dan senyawa yang akan

diisolasi tersebut (Sarker *et al.*, 2006)

Ekstraksi atau penyarian merupakan peristiwa perpindahan massa zat aktif yang semula berada dalam sel, ditarik oleh cairan penyangga zat aktif larut dalam cairan penyari. Pada umumnya penyarian akan bertambah baik apabila permukaan serbuk simplisia yang bersentuhan dengan penyari semakin luas, karena semakin luas permukaan semakin banyak pula bagian tanaman yang berinteraksi (Anonim, 1986). Salah satu metode yang digunakan adalah maserasi.

Maserasi (mengairi, melunakkan) merupakan ekstraksi yang paling sederhana. Bahan simplisia yang dihaluskan sesuai dengan syarat farmakope (umumnya terpotong-potong atau berupa serbuk kasar) disatukan dengan bahan pengestraksi. Selanjutnya rendaman tersebut disimpan terlindung dari cahaya langsung (mencegah reaksi yang dikatalisis cahaya atau perubahan warna) dan dikocok kembali. Waktu lamanya maserasi berbeda-beda, masing-masing farmakope mencantumkan 4-10 hari. Persyaratannya adalah bahwa rendaman tadi harus dikocok berulang-ulang (kira-kira 3 kali sehari). Melalui upaya ini dapat dijamin keseimbangan konsentrasi bahan ekstraktif yang lebih cepat di dalam cairan. Keadaan diam selama maserasi menyebabkan turunnya perpindahan bahan aktif (Voigt, 1995).

## **6. Fraksinasi**

Fraksinasi merupakan prosedur pemisahan yang bertujuan memisahkan golongan utama kandungan yang satu dari kandungan yang lain. Senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar dan senyawa non polar akan masuk ke pelarut non polar (Harborne, 1987).



Metode fraksinasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah menggunakan kromatografi kolom. Kolom diisi dengan penyerap padat sebagai fase tetap dan dialiri dengan pelarut sebagai fase gerak. Cuplikan yang akan difraksi dimasukkan ke dalam kolom dan dialiri fase gerak yang akan membentuk jalur-jalur serapan dari senyawa. Bila pelarut dibiarkan mengalir melalui kolom, ia akan mengangkut senyawa-senyawa yang merupakan komponen-komponen dari campuran. Pemisahan komponen suatu campuran tergantung pada kepolaran dari fase gerak dan senyawa yang terkandung dalam campuran tersebut (Sastrohamidjodjo, 2004).

## **7. Kromatografi lapis tipis**

Kromatografi lapis tipis salah satu alat pemisah dan alat uji senyawa kimia secara kualitatif dan kuantitatif. Senyawa yang diuji dapat berupa senyawa tunggal maupun campuran dari produk pabrik, hasil sintesis isolasi dari hewan percobaan maupun dari tanaman dan mikroorganisme. Alat ini merupakan alat yang mudah penggunaannya, murah dan selektif (Sastrohamidjodjo, 2004).

### **a. Fase diam**

Fase diam yang biasa digunakan dalam kromatografi lapis tipis adalah silika gel. Pembuatan silika gel merupakan silika yang dibebaskan dari air, bersifat sedikit asam. Untuk memperkuat pelapisannya pada pendukung silika gel ditambah gips (kalsium sulfat) sehingga dikenal dengan silika gel G. Sebagai pendukung lapisan tipis digunakan kaca dengan ukuran 20X20cm, 10X20 atau 5X10cm. pendukung yang lain yang dapat digunakan biasanya berupa lenbaran alumunium atau plastik. Silika gel kadang-kadang ditambah

senyawa *fluorescent*, dengan tujuan bila disinari dengan sinar UV silika akan berfluorosensi atau berpendar, sehingga dikenal dengan nama silika gel GF 254 yang artinya silika gel berpendar pada sinar UV 254 nm.

b. Fase gerak

Fase gerak yang biasanya berupa gas atau cairan yang membawa komponen-komponen. Pemilihan fase gerak baik tunggal maupun campuran tergantung pada solut yang dianalisis dan fase diam yang digunakan. Pemilihan fase gerak dapat berpedoman pada kekuatan elusi fase gerak (urutan kemampuan elusi fase gerak terhadap fase diam silika gel/alumina).

Analisis kuantitatif dari suatu senyawa yang telah dipindahkan dengan KLT biasanya dilakukan dengan densitometer langsung pada lempeng KLT (atau secara *in situ*). Densitometer dapat bekerja secara serapan atau fluoresensi. Kebanyakan densitometer mempunyai sumber cahaya, monokromator untuk memilih panjang gelombang yang cocok, sistem untuk memfokuskan sinar pada lempeng, pengganda foton, dan rekorder (Gandjar, 2007).

Penggunaan umum Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah untuk menentukan banyaknya komponen dalam campuran, identifikasi senyawa, memantau berjalannya suatu reaksi, menentukan efektifitas pemurnian, menentukan kondisi yang sesuai untuk kromatografi kolom, serta untuk memantau kromatografi kolom, melakukan *screening* sampel untuk obat (Sastrohamidjodjo, 2004).

c. Deteksi Bercak

Bercak pemisahan pada KLT umumnya merupakan bercak yang tidak berwarna. Untuk penentuannya dapat dilakukan secara kimia, fisika maupun biologi. Cara kimia yang biasa digunakan adalah mereaksikan bercak dengan suatu pereaksi melalui cara penyemprotan sehingga bercak menjadi jelas. (Gandjar, 2007).

## 8. Kromatografi Kolom

Cara pemisahan zat berdasarkan mekanisme adsorpsi, pembagian ion, pertukaran ion, afinitas dan perbedaan ukuran molekul. Kromatografi kolom berdasarkan mekanisme adsorpsi dapat dipergunakan alumina, silika gel, karbon adsorben, Mg Silikat, Mg karbonat, pati, selulosa dan sebagainya.

Sebagai eluennya misalnya air, metanol, etanol, aseton, dan sebagainya. Secara adsorpsi partikel padat dalam cairan akan cenderung mengadsorpsi atom, ion atau molekul pada permukaannya. Ikatan mungkin bersifat ionik, *dipole-dipole*, *dipole-induce dipole*, dan lain-lain. Mekanisme partisi adalah pemisahan zat berdasarkan kelarutannya di antara dua zat cair tak tercampurkan, salah satunya merupakan fase diam yang ditahan oleh zat penunjang padat (Gandjar, 1989).

Terdapat dua teknik dalam mempersiapkan kolom, meliputi:

a. Teknik basah

Serbuk silika dibuat sediaan bubuk dengan eluen (fase gerak) yang telah terpilih untuk pemurnian yang relative encer (sampai dapat di tuang

dalam kolom). Bubur silika dituang dalam kolom sampai setinggi 15–17cm dan dielusi/dihomogenkan dengan eluen (fase gerak) yang telah terpilih untuk pemurnian, hingga tidak nampak adanya gelembung-gelembung udara (eluen boleh diulang-ulang untuk dimasukkan dalam kolom).

b. Teknik kering

Serbuk silika kering dimasukkan dalam kolom sampai setinggi 15–17cm dan dimampatkan dengan cara di ketok-ketokan. Silika dalam kolom dihomogenkan dengan eluen (fase gerak) yang telah terpilih untuk pemurnian, hingga tidak nampak adanya gelembung-gelembung udara (eluen boleh diulang-ulang untuk dimasukkan dalam kolom KK) (Hostettman, 1986).

## 9. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi / HPLC

HPLC secara mendasar merupakan perkembangan tingkat tinggi dari kromatografi kolom. Selain dari pelarut yang menetes melalui kolom dibawah gravitasi, didukung melalui tekanan tinggi sampai dengan 400 atm. Ini membuatnya lebih cepat (Clark, 2007).

HPLC memperbolehkan penggunaan partikel yang berukuran sangat kecil untuk material terpadatkan dalam kolom dimana akan memperluas luas permukaan yang akan berinteraksi antara fase diam dan molekul-molekul yang melintasinya. Hal ini memungkinkan pemisahan yang lebih baik dari komponen-komponen dalam campuran.

Pemisahan mekanisme adsorpsi yang terjadi termasuk dalam jenis mekanisme absorpsi dan sekitar 90% menggunakan fase diam silika. Pada silika terdapat gugus hidroksi yang akan berinteraksi dengan solut. Gugus silanol pada

silika mempunyai reaktifitas yang berbeda, sehingga solut dapat terikat secara kuat dan dapat juga menyebabkan *tailing*.

Pada mekanisme adsorpsi solut-solut akan tertahan karena adanya adsorpsi pada permukaan gugus aktif silanol dan akan terelusi sesuai dengan urutan polaritasnya.

Instrumentasi HPLC pada dasarnya terdiri atas delapan komponen pokok yaitu: (1) wadah fase gerak, (2) sistem penghantaran fase gerak, (3) alat untuk memasukkan sampel, (4) kolom, (5) detektor, (6) wadah penampung buangan fase gerak, (7) tabung penghubung, dan (8) suatu komputer atau integrator atau perekam (Sudjadi, 2007).

#### **E. Keterangan Empiris**

Dari hasil penelitian ini diharapkan memperoleh senyawa asiatikosida hasil isolasi dari herba pegagan (*Centella asiatica* L. Urban) dengan kadar kemurnian yang tinggi setelah diukur secara HPLC.